

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/003403

International filing date: 31 March 2005 (31.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP  
Number: PCT/EP04/003429  
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 27 May 2005 (27.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

Europäisches  
Patentamt

European Patent  
Office

PCT/EP200 5/ 003 403

Office européen  
des brevets



### Bescheinigung

### Certificate

### Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten internationalen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the international patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Den Haag, den  
The Hague,  
La Haye, le

Der Präsident des Europäischen Patentamts  
Im Auftrag  
For the President of the European Patent Office  
Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

Patentanmeldung Nr.  
Patent application no.  
Demande de brevet n°

PCT/EP 04/003429

**Blatt 2 der Bescheinigung**  
**Sheet 2 of the certificate**  
**Page 2 de l'attestation**

---

**Anmeldung Nr.:**  
**Application no.:**  
**Demande n°:**  
**Anmelder:**  
**Applicant(s):**  
**Demandeur(s):**

PCT/EP 04/003429

1. SCHWARTZ-ALBIEZ, Reinhardt - Gaiberg, Deutschland
2. PUNZEL, Michael - Erkath, Deutschland

**Bezeichnung der Erfindung:**  
**Title of the invention:**  
**Titre de l'invention:**

Verfahren zur sequentiellen ex vivo Expansion humaner postembryonaler Stammzellen mit nachfolgender selektiver Differenzierung

**Anmeldetag:**  
**Date of filing:**  
**Date de dépôt:**

31. März 2004 (31.03.2004)

**In Anspruch genommene Priorität(en)**  
**Priority(ies) claimed**  
**Priorité(s) revendiquée(s)**

**Staat:**  
**State:**  
**Pays:**

**Tag:**  
**Date:**  
**Date:**

**Aktenzeichen:**  
**File no.**  
**Numéro de dépôt:**

**Bemerkungen:**  
**Remarks:**  
**Remarques:**

Verfahren zur sequentiellen ex vivo Expansion humaner postembryonaler Stammzellen mit nachfolgender selektiver Differenzierung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur in vitro Generierung von immunkompetenten Zellen (Natürliche Killer Zellen oder NK-Zellen und T-Zellen) die durch Expansion und Differenzierung aus postembryonalen Stammzellen gewonnen werden. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass unter Vermeidung von Differenzierung die Ausgangszellen in einem Medium gezüchtet werden, das ein regio- und stereoselektiv modifiziertes Glycan enthält, wobei die Modifikation so ist, dass dieses Glycan N- und/oder O-gebundene Sulfat-, Amino-, Acetyl- und/oder Acylgruppen in verschiedenen Anordnungen und definierten Positionen in der Monomereinheit und entlang der Polymerkette enthält.

Humane postembryonale, d.h. im wesentlichen hämatopoetische pluripotente Stammzellen aus Nabelschnurblut haben als Stammzellquelle auch im Hinblick auf die ethischen Bedenken beim Umgang mit embryonalen Stammzellen eine große gesundheitspolitische Bedeutung. Allerdings stehen diese Zellen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung. Der klinisch therapeutische Einsatz dieser Zellen ist derzeit aufgrund der nur in sehr geringer Anzahl zur Verfügung stehenden nativen Stammzellen limitiert und kann mit bekannten in vitro Methoden nicht für Stammzelltherapien und Transplantationen ausreichend expandiert werden. Hauptproblem ist dabei die unkontrollierte Differenzierungsinduktion bei gleichzeitigem Stammzellverlust der initial eingesetzten Population.

Die bisherigen Erfahrungen zeigen, dass das nach der Abnabelung in der Plazenta verbliebene und über die Nabelschnur gewinnbare kindliche Restblut (Cord Blood=CB) in der Regel genügend primitive pluripotente hämatopoetische Stammzellen (HSC) enthält, um bei Kindern eine hämatologische und immunologische Rekonstitution zu erreichen. Die Verwendung von CB zur Stammzelltrans-

plantation bei Erwachsenen ist jedoch wegen der nicht ausreichenden Stammzellzahl bei dem heutigen Stand der Technik medizinisch limitiert. Dabei bietet gerade CB den Vorteil, eine große Population von primitiven Stammzellen mit erhöhter Proliferations- und Stammzellpotenz zu enthalten. In letzter Zeit haben mehrere Berichte nachgewiesen, dass Stammzelltransplantationen aus Nabelschnurblut sich als auch vorteilhaft bei allogenen Transplantationen von Patienten mit bösartigen Systemerkrankungen erwiesen haben: Stammzellen aus Nabelschnurblut haben gegenüber solchen aus Knochenmark oder peripherem Blut entscheidende Vorteile:

- Sie sind schnell und unkompliziert ohne körperliche Belastung eines Spenders zu gewinnen,
- Es besteht ein deutlich geringeres Risiko für Übertragung viraler Erkrankungen (insbesondere des Cytomegalieviruses)
- Das Risiko einer sogenannten „graft versus host“ (GvHD) Erkrankung ist wesentlich geringer, so dass bei vergleichbaren Ergebnissen bis zu 2 HLA-Mismatches akzeptiert werden können. Nabelschnurblut-Präparate sind als sogenannte Fertigarzneimittel komplett vorgetestet und eingelagert und innerhalb kürzester Zeit verfügbar.

Der therapeutische Einsatz für hämatologische Transplantationen ist jedoch noch aus folgenden Gründen limitiert:

- Aufgrund der geringen Zellzahl in den Transplantaten steht nur eine begrenzte Anzahl an Stamm- und Progenitorzellen zur Verfügung, was eine sehr lange Aplasiephase mit den entsprechenden klinischen Komplikationen nach der Transplantation zur Folge hat.
- Die Aktivität von immunologischen Effektorzellen, insbesondere der Natural-Killerzellen (NK-Zellen) und T-Zellen im Nabelschnurblut ist im Vergleich zu adulten Quellen stark reduziert. Dies kann auf der einen Seite zu einer

geringeren Inzidenz einer GvHD beitragen, auf der anderen Seite kann es aber Grund für eine erhöhte Morbidität und Mortalität bei den Stammzell-transplantationen aus Nabelschnurblut sein.

5

Es hat sich in mehrere Studien gezeigt, dass NK Zellen und T-Zellen bei allogenen Transplanationen eine wichtige Rolle spielen. Die alloreaktiven Spender-NK-Zellen töten nicht nur residuale Leukämiezellen ab, sondern auch T-Zellen und Antigenpräsentierende Zellen des Wirtes. Diese Immunreaktionen werden über Interaktionen sogenannter „Killer Immunoglobulin-like Rezeptoren“ (KIR-Rezeptoren) und sogenannter Natürlicher Zytotoxizitäts-Rezeptoren (NCR) auf der Spender NK-Zelle mit bestimmten Antigenen des Haupt Histokompatibilitätskomplexes der Klasse I (HLA Kl. I) auf den Wirtszellen gesteuert.

15

Aus diesen Gründen ist eine ex vivo Expansion von primitiven CB-Zellen mit vielseitigem Differenzierungspotenzial für eine erfolgreiche Stammzelltransplantation wichtig. Zum anderen müssen die wenigen primitiven Zellen expandiert werden, um dann durch gezielte Differenzierung der jetzt ausreichend zur Verfügung stehenden Vorläuferzellen ein klinisch einsetzbares Therapeutikum zu generieren.

25

Eine Vielzahl von Arbeiten befasste sich bisher mit der ex vivo Expansion humaner Stammzellen aus Knochenmark und CB, wobei unterschiedliche Kulturzusätze verwendet wurden (unterschiedliche Kombinationen von Cytokinen, Stromazellfeederlayer, Bioreaktoren). In keiner dieser Arbeiten wurde jedoch die Wirkung der jeweiligen Kulturbedingungen auf Selbsterneuerungskapazität der ursprünglichen Stammzellen nachgewiesen. Zum Teil konnten publizierte, auch widersprüchliche Arbeiten von anderen Labors nicht reproduziert werden und müssen daher in ihrer Aussagekraft ange-

30

zweifelt werden. Es ist bisher nicht geklärt, ob nach ex vivo Kultur zur Expansion der Zellzahl und zur Proliferationsinduktion native Stammzellen ihre Eigenschaften und Fähigkeit zur multilinealen Differenzierung und Selbsterneuerung beibehalten und noch zur Transplantation geeignet sind. Es sind bisher auch keine Versuchsbedingungen beschrieben, die ohne stromalen Feederlayer diese Voraussetzungen erfüllen. Alle bisherigen in vitro Kultursysteme haben bei Proliferation der Stammzellen gleichzeitig einen Differenzierungsschub zur Folge. Die alleinige Expansion der Zellzahl, phänotypischer Merkmale wie CD34 oder die Expansion von Progenitoren in liniendeterminierten Assays gibt keine Auskunft über Stammzellen, da nur die Fähigkeit der regenerativen Selbsterneuerung und multilinealen Differenzierung diese Eigenschaft determiniert.

Die Schwierigkeit dabei ist die Analyse humaner Stammzellen im allgemeinen und speziell auch in vitro expandierter Stammzellen in Hinblick auf Zellzahl, Qualität und Differenzierungsgrad. Mehrere in vitro Assays wurden beschrieben, die primitive humane hämatopoetische Vorläuferzellen analysieren: der Long-Term-Culture Initiating Cell (LTC-IC) assay, der „cobblestone area forming cell assay“ (CAFC), beide in Kombination mit „Limiting Dilution Assay“ (LDA) können Aussagen machen über die Häufigkeit der LTC-IC oder CAFC. Die Schwierigkeit besteht jedoch darin, dass diese Assays keine Aussagen nach expandierender in vitro Kultur über die sogenannte „multilineage“ (multilineale, d.h. myeloische, lymphatische, erythrozytäre und thrombozytäre) Selbsterneuerungskapazität der anfänglich vorhandenen primitiven Stammzellen machen können. Dies ist jedoch eine wichtige Voraussetzung, um die Effektivität einer in vitro Kultivierung mit Expansion und gleichzeitiger Differenzierungsarretierung zu überprüfen. Die Zahl und Charakteristik humaner Stammzellen wird bisher in sehr aufwendigen xenogenen Tiermodellen überprüft (in utero-Schaf, NOD-SCID-Maus). Eine Charakterisierung der expandierten Stammzellen auf der Basis einer Zelloberflächenmarker-

analyse ohne gleichzeitige funktionelle Testung ist nicht ausreichend verlässlich. Es hat sich im NOD-SCID-Maus-Modell gezeigt, dass ex vivo expandierte humane Stammzellen zwar die für primitive Stammzellen typischen Oberflächenmarker trugen, jedoch in der SCID Maus nicht mehr zur Selbsterneuerung fähig waren.

Die Differenzierung von funktionellen T-Zellen und NK-Zellen aus Nabelschnurblut würde ebenfalls in der Literatur vorbeschrieben, allerdings konnten hier keine Expansionen nachgewiesen werden, die für ein Therapeutikum notwendig sind.

10

Schließlich wurde in einer kürzlich erschienenen Arbeit beschrieben, dass Komplexe von kationischem Chitosan und verschiedenen Glykosaminoglycanen, insbesondere Heparin und Chondroitinsulfat B als Festphase und unter Zusatz von Stammzellfaktor und IL-3 die Expansion von CD34+ CB Zellen fördern können. Diese Arbeit, wie auch die anderen oben beschriebenen, macht allerdings keine Aussage über den spezifischen Differenzierungsstand der eingesetzten CD34+ Zellen, so dass auch über die Expansion einzelner CD34+ Subpopulationen sowie primitiver CD34+ Stammzellen keine Aussage möglich ist bzw. auch nicht gemacht wurde. Es wurde beschrieben, dass Heparansulfat, synthetisiert von bestimmten Stromazellen, Wachstum und Differenzierung primitiver humaner hämatopoetischer Knochenmarksstammzellen (KM-HSC) regulieren kann. Es wurde weiter gezeigt, dass solche KM-HSC ohne den Zusatz von Stromazellen nur in Gegenwart von bestimmten Glycosaminoglycanen *in vitro* für eine Zeitspanne von 5 Wochen bis maximal 80% erhalten werden können. Dabei wurde nur die 6-O-Sulfatierung des Heparins als das wesentliche strukturelle Element des Heparins beschrieben, welches diesen Effekt auslöst, mit desulfatiertem-, N-sulfatiertem oder unmodifiziertem Heparin konnten die wachstumsfördernden Effekte nicht erzielt werden.

30

Zusammenfassend lässt sich zu den vorstehenden Arbeiten folgendes feststellen:

35





1. Es konnte zwar gezeigt werden, dass 6-O-sulfatierte Heparine ausschließlich myeloisch-determinierte Zellen (Langzeitkultur induzierende Zellen; LTC-IC) aus humanem Knochenmark bis zu 80% über 5 Wochen erhalten können; allerdings erfolgte dies ohne nachweisbare Expansion des primitiven Stammzellpools.

2. Der Nachweis inwieweit tatsächlich primitive und multipotente HSC beeinflusst werden, konnte bisher nicht erbracht werden.

3. Zellwachstums-modifizierende Eigenschaften von Heparinen und anderen Polysacchariden wurden in einer Reihe von Publikationen beschrieben, allerdings wurden dabei weder humane hämatopoetische Stammzellen berücksichtigt, noch die Differenzierung in therapeutisch wirksame Immunzellen benannt.

Somit liegt der vorliegenden Erfindung das technische Problem zugrunde, diese Nachteile der im Stand der Technik angewandten Verfahren zu überkommen, d.h. Mittel bereitzustellen, die die Expansion nicht-embryonaler Stammzellen unter Verhinderung der Differenzierung erlauben aber zum richtigen Zeitpunkt in der ex vivo Kultur eine gezielte Differenzierung in immunkompetente Zellen (T-Zellen und NK-Zellen) zu ermöglichen. Als zusätzliches Problem beim derzeitigen Stand der Technik besteht die Notwendigkeit der Benutzung von Mauszelllinien als Stromafeeder zur Expansion/Generierung von funktionellen Immunzellen, so dass gegenwärtig keine klinische Anwendbarkeit von expandierten NK- oder T-Zellen speziell aus Nabelschnurblut möglich ist.

Die Lösung dieses technischen Problems erfolgte durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen. Es wurde überraschenderweise gefunden, dass das vorstehende technische Problem durch die Verwendung eines modifizierten Glycans als Zusatz zu einem Zuchtungsmedium gelöst werden kann. Diese Vorgehensweise erlaubt die Gewinnung und Expansion primitiver post-embryonaler Stammzellen aus einer klei-

nen Zellzahl. Die Stammzellen können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren *in vitro* so vermehrt werden, dass eine (Re)implantation der expandierten Zellen auch unter klinischen Bedingungen sowohl für die Regeneration der Hämatopoese als auch für den spezifischen Gewebs- und Organersatz angewendet werden kann. Das erfindungsgemäße Verfahren gewährleistet, dass reproduzierbar die primäre Differenzierung dieser pluripotenten Stammzellen durch gezielten Einsatz von regio- und/oder stereoselektiv modifizierten Glycanen reversibel arretiert werden kann, um eine *in vitro* Expansion zu erreichen. Durch die Anwendung der erfindungsgemäßen Glycane bzw. Glycosaminoglycane in einem sogenannten „*in vitro* Stammzellkultursystem“ können somit transplantationsfähige Stammzellen aus post-embryonalen Geweben expandiert werden. Die so expandierten Stammzellen werden dann unter Verwendung der erfindungsgemäßen Glycane in speziellen Differenzierungskulturen bis zur funktionellen Reife ausdifferenziert.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf der Anwendung von definierten Glycanen bzw. Glycosaminoglycanen durch regio- und/oder stereoselektive Modifikationen (Abbau, Ankopplung) funktioneller Seitengruppen (z.B. Carboxyl-, Sulfat-, Acetyl-, Acyl-, Aminogruppen) z.B. an bekannte Glycangerüste ( $\alpha$ 1-4 Glycane,  $\beta$ 1-3 Glycane,  $\beta$ 1-4 Glycane,  $\beta$ 1-3 Glycosaminoglycane,  $\beta$ 1-4 Glycosaminoglycane und  $\beta$ 1-4,  $\alpha$ 1-4 Glycosaminoglycane). Diese Verbindungen sind hinsichtlich (a) ihrer Molekülmasse, (b) ihres Sulfatierungsgrades und -musters, und (c) der Anzahl anderer vorstehend genannter funktioneller Seitengruppen und Verteilung der funktionellen Gruppen in der Monomereinheit und entlang der Polymerkette genau definiert.

Die Veränderungen der Seitengruppen zur erfindungsgemäßen Verwendung bestehen zum einen aus einer Modifikation einer Seitengruppe am C2 Atom der Monomereinheit des Glycans bzw. Glycosaminoglycans, vorzugsweise Desulfatierung und Reacylierung oder

Reacetylierung, so dass definierte Verhältnisse der Seitengruppen am C2 Atom entlang der Polymerkette entstehen. Zum anderen ist die Anwesenheit einer Seitengruppe mit negativer Ladung, vorzugsweise eine 6-O-Sulfatgruppe, am C6 Atom der Monomereinheit des Glycans bzw. Glycosaminoglycans eine sterische Voraussetzung für das erfindungsgemäße Verfahren. Der Prozentsatz der insgesamt modifizierten Seitengruppen am C2 und/oder C6 Atom hängt von der jeweiligen Modifikation ab und der für das erfindungsgemäße Verfahren günstigste Prozentsatz kann mittels der im nachstehenden Beispiel genannten Assays vom Fachmann leicht ermittelt werden.

Diese Verbindungen können als Zusatz in Expansions- und Differenzierungskulturen adulter (post-embryonaler) Stammzellen für sämtliche klinische und industrielle Anwendungen verwendet werden. Einer der wesentlichen Vorteile der Erfindung liegt im Einsatz einzelner chemisch genau definierter Substanzen zur reproduzierbaren Expansion postembryonaler Stammzellen.

In den zu der vorliegenden Erfindung führenden Experimenten wurden primitive hämatopoetische Stammzellen *in vitro* unter Zusatz von erfindungsgemäßen Polysacchariden und definierten Cytokinen ohne die Kokultivierung mit Stromazellen oder anderen Feederzellen in ihrem ursprünglichen primitiven Zustand erhalten und gleichzeitig expandiert. Das Differenzierungspotential dieser Zellen wurde in anschließenden Kulturen auf Einzelzellebene nachgewiesen. Die eingesetzten Polysaccharide mit definierten funktionellen Gruppen zeichnen sich durch ihren definierten Anteil an 6-O-Sulfat- und N-Sulfatgruppen, 2-O- und 3-O-Sulfatgruppen aus. Es handelt sich dabei um regio- und stereoselektiv sulfatierte, acetylierte und acylierte Wiederholungseinheiten von Polysacchariden mit unterschiedlich einstellbaren definierten Durchschnittssubstitutionsgraden für die einzelnen Gruppen. Durch die Konstellation der jeweiligen Seitengruppen mit unterschiedlichem Charakter (hydrophil, z.B. -

SO<sub>3</sub>; hydrophob, z.B. -acyl) und definierter Verteilung entlang der Polymerkette werden die hydrophoben/hydrophilen Verhältnisse innerhalb des Glycans bzw. Glycosaminoglycans wesentlich verändert.

5

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Isolierung und/oder Anreicherung und/oder selektiven Vermehrung post-embryonaler Stammzellen unter Vermeidung von primärer Differenzierung, die anschliessend in gerichteten Differenzierungskulturen wiederum unter Verwendung der erfindungsgemäßen Glycane/Glycosaminoglycane in therapeutisch einsetzbare NK-Zellen oder T-Zellen differenziert werden können. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass die Ausgangszellen in einem Medium gezüchtet werden, das ein modifiziertes Glycan und/oder  
10 Glycosaminoglycan enthält, wobei die Modifikation so ist, dass die ursprüngliche Seitengruppe des C2 Atoms einer oder mehrerer Monomereinheiten des Glycans und/oder Glycosaminoglycans modifiziert ist und die Seitengruppe des C6 Atoms einer oder mehrerer Monomereinheiten des Glycans und/oder Glycosaminoglycans  
15 eine Seitengruppe mit negativer Ladung, vorzugsweise eine 6-O-Sulfatgruppe ist, wobei ein definiertes Verhältnis zwischen hydrophilen und hydrophoben Seitengruppen besteht.

Vorzugsweise ist das Glycan und/oder Glycosaminoglycan  $\alpha$ 1-4  
25 Glycan,  $\beta$ 1-3 Glycan,  $\beta$ 1-4 Glycan,  $\beta$ 1-3-Glycosaminoglycan,  $\beta$ 1-4 Glycosaminoglycan und/oder  $\beta$ 1-4,  $\alpha$ 1-4 Glycosaminoglycan.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das C2 Atom einer Monomereinheit desulfa-  
30 tiert.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das C2 Atom einer Monomereinheit desulfa-  
35 tiert und eine neue Seitengruppe ist am C2 Atom eingeführt, vorzugsweise eine Acetyl-, Acyl- (vorzugsweise Butyl-), Amino-

oder Carboxymethyl-Gruppe. Besonders bevorzugt ist eine Acetyl- oder Acyl-Gruppe. Unter Reacetylierung wird die Ankopplung einer Acetylgruppe an das C2 Atom der Monomereinheit verstanden.

- 5 Der vorteilhafteste Prozentsatz der jeweils modifizierten C2 und/oder C6 Atome kann wie bereits vorstehend erwähnt leicht mittels der nachstehend beschriebenen Assays bestimmt werden.

Bei dem in der vorliegenden Anmeldung verwendeten Ausdruck „post-embryonale Stammzellen“ handelt es sich um pluripotente Stammzellen, vorzugsweise humane Stammzellen.

Der in der vorliegenden Anmeldung verwendete Ausdruck „Ausgangszellen“ betrifft die frisch (z.B. aus dem Nabelschnurblut) isolierten, nicht expandierten post-embryonalen Stammzellen.

Der in der vorliegenden Anmeldung verwendete Ausdruck „unter Vermeidung von Differenzierung“ meint, dass während der Expansion die Zellen in einem pluripotenten Stadium verbleiben, das vorzugsweise dem vor der Expansion entspricht. Das pluripotente Stadium der Zellen kann durch den ML-IC Assay wie nachstehend beschrieben kontrolliert und bestätigt werden.

25 Diese Zellen können jedoch während oder im Anschluss an die Expansion, falls gewünscht, zu einer bestimmten Differenzierung veranlaßt werden, z.B. durch Zugabe von bestimmten Zytokinen in das Medium. Zur Differenzierung zu Endothel-Zellen wird z.B. Fibronektin (FN) und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)-B  
30 in das Medium gegeben (Reyes et al., Blood 98 (2001), 2615-2625; Reyes et al., J. Clin. Invest. 109 (2002), 337-346), zur neuroektodermalen Differenzierung FN und bFGF (Palmer et al., J. Neurosci. 19 (1999), 8487-8497) und zur Differenzierung zu Epithelzellen FGF-4 und Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) (Schwartz et al.,  
35 J. Clin. Invest. 109 (2002), 1291-1302).

In einer Ausführungsform der Erfindung werden aus den primär expandierten Zellen sekundär NK- und T-Zellen herausdifferenzierten und durch die allgemein bekannten Oberflächenmarker phänotypisch und funktionell nachgewiesen.

Bei den für die vorliegende Anmeldung verwendeten Kohlenhydraten-Grundstrukturen handelt es sich um Verbindungen wie sie von der „IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) definiert wurden (Eur. J. Biochemistry 126 (1982), 439-441) und beispielsweise von S.Dumitriu (Polysaccharides in Medical Applications, Marcel Dekker, 1996) sowie J.Lehmann (Kohlenhydrate, Chemie und Biologie, G.Thieme Verlag, 1996) beschrieben wurden. Dabei werden unter dem Ausdruck Glycane alle Oligo- und Polysaccharide zusammengefasst, die von ihrem sequentiellen Aufbau sowohl Homoglycane, bestehend aus einer Monosaccharidwiederholungseinheit, als auch Heteroglycane, bestehend aus verschiedenen Monosaccharidwiederholungseinheiten, sein können.

Als Oligosaccharide/Polysaccharide werden Verbindungen zusammengefasst, in denen Monosaccharide durch glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Oligosaccharide und Polysaccharide mit repetitiven Saccharidsequenzen werden hier als Glycane zusammengefasst. Der Begriff „Oligosaccharid“-bezeichnet Glycane, die aus 2 bis 10 Monosaccharideinheiten bestehen, während der Begriff „Polysaccharid“ alle Glycane umfasst, die aus mehr als 10 Monosaccharideinheiten bestehen.

Als Glycosaminoglycane werden Heteroglycane mit repetitiven Disaccharideinheiten jeweils bestehend aus einem Aminosucker und einer Uronsäure definiert, die sich untereinander hinsichtlich ihrer Monosaccharideinheiten und ihrer glycosidischen Bindung unterscheiden.

Die für das erfindungsgemäße Verfahren verwendbaren Glycane bzw. Glycosaminoglycane können unterschiedliche Verknüpfungs- und Verzweigungsgrade aufweisen, d.h. z.B. linear, verzweigt oder zyklisch (z.B.  $\beta$ -Cyclodextrin) sein. Hinsichtlich ihres Molekulargewichts unterliegen die für das erfindungsgemäße Verfahren verwendbaren Glycane bzw. Glycosaminoglycane keiner Einschränkung, allerdings ist offensichtlich die biologische Aktivität bei größeren Molekülen besser. Günstige Molekulargewichte liegen im Bereich von etwa 10 bis 35 kD oder darüber.

10

Der Fachmann kann mittels allgemein bekannter Verfahren, z.B. über klassische Schutzgruppentechniken und/oder Festphasensynthese die für das erfindungsgemäße Verfahren geeigneten Poly-/Oligosaccharide herstellen. Verfahren zum Entfernen bzw. Ankoppeln von Seitenketten, z.B. zur regio- und stereoselektiven Modifikation sind ebenfalls allgemein bekannt; siehe z.B. Baumann et al., Carbohydrate Res. 308 (1998), 391-388; 331 (2001), 43-57; Baumann et al., Carbohydrate Res. 337 (2002), 1297-1307; Baumann et al., Macromol. Chem. Phys. 201 (2000), 1950-1962; Deutsches Patent 4444445.1; Huppertz et al., In: Frontiers in Biomedical Polymer Applications (Eds. Othenbrite, Chielbini, Cohn, Miglioresi, Sunamoto), Band 2, Seiten 115-129, Technomic 1999; Grootenhuis et al., Nat. Struct. Biol. 2 (1995), 736-739; Westerduin et al., Bioorg. Med. Chem. 2 (1994), 1267-1280; Wessel et al., Carbohydr. Res. 204 (1990), 131-139; Matsuo et al., Carbohydr. Res. 241 (1993), 209-215; Kurita et al., Macromolecules 31 (1998), 4764-4769; Kariya et al., J. Biol. Chem. 275 (2000), 25949-25958; Du et al., Carbohydr. Res. 329 (2000), 17-24; und Groth und Wagenknecht, Biomaterials 22 (2001), 2719-2729.

30

Der Fachmann kennt auch geeignete Züchtungsverfahren und Medien, um post-embryonale Stammzellen kultivieren zu können; siehe z.B. DE 196 08 813 C2 oder EP-B1 0 695 351 bzw. das nachfolgende Beispiel. Der Fachmann kann auch anhand einfacher Ver-

35



suche die optimale Konzentration des modifizierten Glycans bzw. Glycosaminoglycans für den gewünschten Zweck bestimmen. Das „Grundmedium“, das u.a. ein erfindungsgemäßes modifiziertes Glycan bzw. Glycosaminoglycan enthält kann jedes Medium sein, das üblicherweise für die Stammzellexpansion verwendet wird. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mediums ist das „Grundmedium“, in dem u.a. ein erfindungsgemäßes Glycan bzw. Glycosaminoglycan enthalten ist, IMDM („Iscoves Modifiziertes Dulbeccos Medium“; Invitrogen). Die gewünschten Stammzellen werden in dem vorstehenden Medium unter geeigneten Bedingungen, gegebenenfalls unter (teilweiser) Erneuerung des Mediums in geeigneten Zeitabständen, gezüchtet. Geeignete Bedingungen, beispielsweise hinsichtlich geeigneten Behältern, Temperatur, relativer Luftfeuchte, O<sub>2</sub>-Gehalt und CO<sub>2</sub>-Gehalt der Gasphase sind dem Fachmann bekannt. Vorzugsweise werden die Zellen in dem vorstehenden Medium unter den folgenden Bedingungen kultiviert: (a) 37°C, (b) 100% rel. Luftfeuchte, (c) 10% O<sub>2</sub> und (d) 5% bis 7% CO<sub>2</sub>. Der Fachmann kann auch die gewünschte Steuerung der Differenzierung der tierischen Zellen anhand üblicher Kriterien (morphologische Kriterien, Anwesenheit bzw. Abwesenheit spezifischer Oberflächenproteine etc.; siehe dazu auch die Assays im nachstehenden Beispiel) überwachen.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens betrifft die Isolierung und/oder Anreicherung und/oder selektive Vermehrung von post-embryonalen Stammzellen unter Verwendung eines 2-O-desulfatierten Heparins, N-desulfatierten und/oder N-desulfatierten und reacctylierten Heparin enthaltenden Mediums. Dabei erfolgt die Züchtung bzw. Haltung der Zellen wie vorstehend bzw. in dem nachstehenden Beispiel beschrieben.

Der Fachmann kann anhand einfacher Versuche die für das erfindungsgemäße Expansionsverfahren geeigneten Konzentrationen der modifizierten Glycane bzw. Glycosaminoglycane ermitteln. In ei-

ner bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Expansionsverfahrens ist das modifizierte Glycan bzw. Glycosaminoglycan in einer Konzentration von 15 bis 50 mg/l im Kulturmedium vorhanden, wobei eine Konzentration von 20 mg/ml am meisten bevorzugt ist.

Für das erfindungsgemäße Züchtungsverfahren können folgende nicht-embryonale, vorzugsweise humanen Stammzellen verwendet werden: Gonadale Stammzellen, somatische Stamm- oder Vorläuferzellen, hämatopoetische Stammzellen, epidermale Stammzellen, kardiale Stammzellen, Muskelstammzellen oder neurale Stammzellen, wobei hämatopoetische Stammzellen bevorzugt sind. Der Fachmann kennt geeignete Quellen zur Gewinnung und zur Expansion dieser Stammzellen. Hämatopoetische Stammzellen können z.B. aus fötaler Leber, Nabelschnurblut oder Knochenmark erhalten werden, wobei die Gewinnung aus Nabelschnurblut für das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt im Anschluß an die Züchtung ein funktioneller Nachweis der Stammzeleigenschaften und/oder des Expansionsgrades. Besonders bevorzugt ist der Nachweis der Stammzeleigenschaften über einen ML-IC-Assay.

25

Das nachstehende Beispiel erläutert die Erfindung.

30

#### Beispiel

Expansion hämatopoetischer Stammzellen mittels modifizierter Heparine als Zusatz zum Züchtungsmedium.

Stammzellangereicherte Nabelschnurblutzellen wurden in einem definierten und klinisch applizierbaren Expansionssystem unter Zu-

satz erfindungsgemäßer Glycane mit Bestimmung der Expansion primitiver myeloischer als auch lymphatischer Vorläuferzellen als Zeichen der Stammzellvermehrung (quantifizierbar als ML-IC; „Myeloid-Lymphoid-Initiating Cells“) für 5 Wochen kultiviert.

5

Das Kulturmedium bestand aus „Iscoves modifiziertem Dulbeccos Medium“ (Invitrogen, Karlsruhe) mit 12,5% fötalem Kälberserum und 12,5% Pferdeserum (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada). Dazu wurden die in Tabelle 1 beschriebenen, sterilisierten Glycane mit funktionellen Seitengruppen in einer Konzentration von 20 mg/l sowie folgende Zusätze supplementiert: 2 mmol/l L-Glutamin (Invitrogen), Penicillin (1000 U/ml), Streptomycin 100 U/ml (Invitrogen),  $10^{-6}$  mmol/l Hydrocortison, 25  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol-B, 10 pg/ml GM-CSF (Immunex Corp., Seattle, WA), 250 pg/ml G-CSF (Amgen, Thousand Oaks, CA), 200 pg/ml SCF (Stem Cell Technologies), 50 pg/ml LIF (Stem Cell Technologies), 200 pg/ml MIP-I alpha (Stem Cell Technologies), und 50 pg/ml IL-6 (Stem Cell Technologies), 10 ng/ml Flt-3L und 10 ng/ml Thrombopoetin (Immunex Corp., Seattle, WA).

Die Kulturen wurden bei 37°C and 5% CO<sub>2</sub> mit 48stündigem Mediumwechsel für 5 Wochen erhalten, anschließend wurde die Expansion der stammzelläquivalenten multipotenten Zellen im ML-IC Assay (Nachweis von LTC-IC und LY-IC) ermittelt.

ML-IC-Assay: Zur Testung der Stammzeleigenschaften der ex vivo kultivierten Nabelschnurblutzellen wurde der ML-IC-Assay (Punzel et al., Blood 93 (1999), 3750-3756) verwendet. Die Zellen der Primärkulturen wurden durch mechanische Pipettierung gleichmäßig in Suspension gebracht und anschließend wurde der Inhalt jeder individuellen Primärkultur (200  $\mu$ l) in 4 neue, bereits präetablierte AFT024-stromaabhängige Sekundärkulturen gebracht (50  $\mu$ l Primärsuspension pro Sekundärkultur), und zwar in der

Art und Weise, dass jede der 4 Sekundärkulturen einer primären Einzelzelle sich in der gleichen Position in den neuen Microtiterplatten befand. Damit wurde gewährleistet, dass alle sekundären Progenitoren sich der primären Einzelzelle zuordnen lassen. Zwei der Sekundärkulturen wurden dabei unter myeloischen Bedingungen im sekundären LTC-IC-Assay über 5 Wochen kultiviert. Die anderen zwei Kulturen wurden unter lymphatischen *in vitro* Differenzierungsbedingungen ebenfalls für weitere 5-7 Wochen im NK-IC Assay kultiviert und anschließend auf reife funktionelle NK-Zellen mittels des NK-IC Assays untersucht.

LTC-IC-Assay (Gupta et al., Blood 95 (2000), 147-155): Frisch sortierte Einzelzellen (Tag 0) oder die gesamte Nachkommenschaft einer Einzelzelle (Tag 14) wurden in AFT024 Kulturen mit Langzeitkultur (LTBMC)-Medium (IMDM/12,5% FCS/12,5% Pferdeserum sowie Penicillin/Streptomycin und  $10^{-6}$  mmol Hydrocortison) kultiviert (1 x Mediumwechsel alle 7 Tage). Nach 5 Wochen wurde das Medium entfernt und die Kultur mit semisolidem Methylzellulose-Medium (1,12% Methylzellulose, IMDM/30% FCS, 3IU/ml Erythropoetin, 7,5% zytokinhaltigem Überstand der Zelllinie 5637 ATCC HB-5) versehen. Einzelzellen mit der Fähigkeit sekundäre kolonieformende Zellen (CFC) zu generieren wurden per Definition als LTC-IC bezeichnet.

LY-IC Assay: Frisch sortierte Einzelzellen (Tag 0) oder die gesamte Nachkommenschaft einer Einzelzelle (Tag 14) wurden in AFT024 Kulturen in lymphatischem Differenzierungsmedium (DMEM/Ham's 12-Medium 2:1 (V/V) mit 20% humanem hitzeinaktiviertem AB-Serum sowie 20 mg/ml Ascorbinsäure, 50  $\mu$ mol Selen, 25  $\mu$ mol Mercaptoäthanol, 50  $\mu$ mol Äthanolamin, 1000 U/ml IL-2, 5 ng/ml IL-3 [nur am Tag 0], 10 ng/ml Flt-3L, 10 ng/ml SCF und 20 ng/ml IL-7) kultiviert. Nach 5-7 Wochen wurden alle Kulturen mit visuell objektivierbarer klonaler Zellproliferation durch mechanische Pipettierung geerntet und mittels FACS-Analyse auf

reife NK-Zellen (CD56+/CD3-) NKT-Zellen (CD56+/CD3+) und auch Pro-B-Zellen (CD 19+/CD56-) untersucht.

Zur GMP-gerechten Anwendung werden die vorexpanzierten Zellen in Suspensionskulturen weiter expandiert unter folgenden Bedingungen:

DMEM/Ham's 12-Medium 2:1 (V/V) mit 10% humanem hitzeinaktiviertem AB-Serum sowie 20 mg/ml Ascorbinsäure, 50 µmol Selen, 25 µmol Mercaptoäthanol, 50 µmol Äthanolamin, 1000 U/ml IL-2, 10 ng/ml Flt-3L, 10 ng/ml SCF, 20 ng/ml IL-7, 10 ng/ml IL-15 und 10 ng/ml IL-21) kultiviert. Nach 3-4 Wochen wurden die Zellen durch mechanische Pipettierung geerntet und mittels FACS-Analyse auf reife funktionelle NK-Zellen (CD56+/CD3-/NKp30/NKp44/NKp46) und auch T-Zellen (CD3+) untersucht.

Primär kultivierte Einzelzellen, die in der Lage waren sowohl LTC-IC als auch lymphatische Effektorzellen zu generieren, sind stammzelläquivalente ML-IC. Die Expansion der Nabelschnurblutzellen errechnet sich aus dem Verhältnis von unreifen LTC-IC und NK-IC vor und nach der Expansionskultur.

Die Ergebnisse der vorstehenden Untersuchungen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

Expansion	H0	H1	H2	H3	C1	C2
Myeloisch	1,0	3,9	10,7	11,8	0,3	2,0
Lymphatisch	1,0	15,2	11,7	12,4	7,4	7,7

H0: Standard-Heparin (unmodifiziert); H1: 2-O-desulfatiertes Standard-Heparin;; H2: N-desulfatiertes Standard-Heparin; H3: N-desulfatiertes und reacctyliertes Standard-Heparin, C1: Chitosan N-Sulfatiert; C2: Chitosan N-desulfatiert, N-acetyliert.

Tabelle 2

Regioselektiv-modifiziertes Glykan	C2-O-Sulfat	C6-O-Sulfat	C2 N-Sulfat	C2 N-Acetyl
H0	60%	90%	90%	7%
H1	9%	85%	90%	5%
H2	60%	85%	0%	14%
H3	60%	85%	0%	100%
C1	-	-	88%	12%
C2	-	-	59%	41%

Die eigentliche Stammzellexpansion ergibt sich aus der kombinierten Erhöhung der myeloischen und lymphatischen Expansionsfähigkeit der in den oben beschriebenen Expansionsbedingungen manipulierten CB-HSC. Der Zusatz von regio- und stereoselektiv modifizierten Glycanen zeigt im Vergleich zu den Kulturen mit unmodifiziertem Heparin (H0) einen signifikanten Expansionseffekt. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass für den durch modifizierte Glycane erzeugten Effekt auf die Expansion von CB-HSC eine Desulfatierung am C2-Atom mit oder ohne Reacetylierung verantwortlich ist.

Chemikalien: Standard-Heparin: Serva, Natriumheparinat aus Schweinemukosa, reinst für Forschungszwecke geeignet, Aktivität 178,000 IU/g. Die übrigen Chemikalien waren, sofern nicht anders angegeben, reine Substanzen der Firmen Aldrich, Fluka oder

5 Sigma.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung und/oder Anreicherung und/oder selektiven Vermehrung post-embryonaler Stammzellen unter Vermeidung von primärer Differenzierung, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausgangszellen in einem Medium gezüchtet werden, das ein modifiziertes Glycan und/oder Glycosaminoglycan enthält, wobei die Modifikation so ist, dass die Seitengruppe des C2 Atoms einer oder mehrerer Monomereinheiten des Glycans und/oder Glycosaminoglycans modifiziert ist und die Seitengruppe des C6 Atoms einer oder mehrerer Monomereinheiten des Glycans und/oder Glycosaminoglycans eine Seitengruppe mit negativer Ladung ist, wobei ein definiertes Verhältnis zwischen hydrophilen und hydrophoben Seitengruppen besteht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Glycan und/oder Glycosaminoglycan  $\alpha$ 1-4 Glycan,  $\beta$ 1-3 Glycan,  $\beta$ 1-4 Glycan,  $\beta$ 1-3-Glycosaminoglycan,  $\beta$ 1-4,  $\beta$ 1-3 Glycosaminoglycan,  $\beta$ 1-4,  $\beta$ 1-3, ( $\alpha$ 1-3) und/oder  $\beta$ 1-4,  $\alpha$ 1-4 Glycosaminoglycan ist.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei das C2 Atom einer oder mehrerer Monomereinheiten desulfatiert ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das C2 Atom desulfatiert und reacyliert oder reacctyliert ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Ausgangszellen in einem Medium mit 2-O-desulfatiertem Heparin, N-desulfatiertem Heparin und/oder N-desulfatiertem und reacctyliertem Heparin gezüchtet werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das modifizierte Glycan und/oder Glycosaminoglycan in einer Konzentration von 15 bis 50 mg/l im Medium vorhanden ist.



7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die post-embryonalen Stammzellen hämatopoetische Stammzellen sind (CB-HSC, Knochenmark-HSC, mittels Apherisation gewonnene G-CSF-stimulierte HSC).
- 5 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Stammzellen humane Stammzellen sind.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei im  
10 Anschluß an die primäre Expansion eine gezielte Differenzierung in funktionelle T- und NK-Zellen erfolgt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei im Anschluß an die Züchtung ein funktioneller Nachweis der Stamm-  
15 zelleigenschaften und/oder des Expansionsgrades erfolgt.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei der Nachweis der Stammzelleigenschaften über einen ML-IC-Assay erfolgt.
- 20 12. Verwendung der nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 generierten T- und/oder NK-Zellen als Therapeutikum.

### Zusammenfassung

Verfahren zur sequentiellen Expansion humaner postembryonalen Stammzellen *ex vivo* mit nachfolgender selektiver Differenzierung

5

Beschrieben wird ein Verfahren zur *in vitro* Expansion postembryonaler Stammzellen unter Vermeidung von primärer Differenzierung, dass es ermöglicht unter GMP-Bedingungen funktionelle

10 Natürliche Killerzellen als Therapeutikum zu generieren. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass die Ausgangszellen in einem Medium gezüchtet werden, welches ein modifiziertes Glycan und/oder Glycosaminoglycan enthält, das am C6 Atom und C2 Atom der Monosaccharidwiederholungseinheit definierte Seitengruppen entlang der Polymerkette trägt.

15

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT**NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

To:

BENEDUM, Ulrich  
Haselline Lake Partners  
Rosenheimer Strasse 30  
81669 München  
ALLEMAGNE

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 24 June 2005 (24.06.2005)	
Applicant's or agent's file reference GP10003PC00	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2005/003403	International filing date (day/month/year) 31 March 2005 (31.03.2005)
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 31 March 2004 (31.03.2004)
Applicant SCHWARTZ-ALBIEZ, Reinhard et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
31 March 2004 (31.03.2004)	PCT/EP04/003429	EP	27 May 2005 (27.05.2005)

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

M. OUCHOUKHI (Fax : 338 89 75)

Facsimile No. (41-22) 338.89.75

Telephone No. +41 22 338 8566

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Form PCT/IB/304 (January 2004)

CHQC63LU